



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO
DE CIÊNCIAS DA VIDA
E DA NATUREZA**

BIOTECNOLOGIA

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS POR BACTÉRIAS DA SALIVA DE CÃES
DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU**

LÍGIA ABBOUD GERKE

Foz do Iguaçu

2019



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO
DE CIÊNCIAS DA VIDA
E DA NATUREZA**

BIOTECNOLOGIA

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS POR BACTÉRIAS DA SALIVA DE CÃES
DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU**

LÍGIA ABBOUD GERKE

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado ao Instituto Latino-Americano
de Ciências da Vida e da Natureza da
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Michel Rodrigo
Zambrano Passarini

Foz do Iguaçu

2019

LÍGIA ABBOUD GERKE

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS DA SALIVA DE CÃES DA
CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU**

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado ao Instituto Latino-Americano
de Ciências da Vida e da Natureza da
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Michel Rodrigo
Zambrano Passarini

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA

Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

Me. Juliana Kafka Bilha
UNILA

Foz do Iguaçu, 06 de Dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelos dons, por todas as oportunidades e pela capacitação que me concedeu para que mais essa etapa pudesse ser concluída.

Aos meus pais Lincoln Villi Gerke e Monica Abboud Gerke por todo o esforço investido em minha educação, e por todo o apoio e incentivo que foram meu alicerce durante essa trajetória. Sem vocês, nada disso seria possível. Agradeço também por todo o apoio e compreensão da minha família.

Agradeço ao meu orientador Michel Rodrigo Zambrano Passarini por toda dedicação, paciência e tempo investido durante todo o projeto, e por todas as valiosas contribuições.

Um agradecimento especial para Giseli Karerina Traesel, Giseli Aparecida Zimmer e Fernando Cezar dos Santos por toda paciência e auxílio através de suas experiências, sendo de grande relevância para o decorrer deste projeto.

Agradeço à Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos e à Me. Juliana Kafka Bilha pela participação na banca avaliadora e pela grande contribuição e compartilhamento de experiências que me foram de grande auxílio na elaboração deste trabalho.

Quero agradecer à Universidade Federal de Integração Latino-Americana pelo suporte com os insumos de laboratório utilizados no presente trabalho, e a todos os meus professores pelo comprometimento com a qualidade e excelência do ensino, e por todo o apoio e parceria também fora da sala de aula.

Agradeço aos meus amigos por todo apoio, encorajamento, parceria e compreensão, que me impulsionaram durante toda essa trajetória.

Agradeço também a todos os meus amigos do curso de graduação que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sempre com o espírito colaborativo.

E a todos os que participaram direta ou indiretamente da minha formação e da conclusão desse projeto, deixo aqui minha gratidão.

GERKE, Lígia Abboud. **RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS POR BACTÉRIAS DA SALIVA DE CÃES DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU**. 2019. 46. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

RESUMO

A presença de animais de estimação nas residências brasileiras é uma prática que vêm aumentando cada vez mais. Os cães são considerados animais que estão em contato muito próximo aos seus donos, conseqüentemente são transmissores potenciais de muitas doenças bem como possíveis micro-organismos resistentes a certos antibióticos comerciais. Bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Moraxella*, *Bacillus*, bem como da família Enterobacteriaceae, foram encontrados na microbiota oral dos cães, segundo alguns estudos. Dentro desses gêneros existem bactérias patogênicas aos seres humanos, sendo sua presença na saliva de cães um risco tanto à saúde canina quanto humana. O conhecimento da presença de bactérias de importância clínica associadas à saliva de animais domésticos pode representar uma estratégia para avaliar os riscos de contaminação ao homem. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência a antimicrobianos por bactérias isoladas da saliva de cães domésticos. De um total de sete amostras de saliva, doze linhagens bacterianas foram isoladas, pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* e *Enterococcus*, utilizando meios de cultivo seletivos. A resistência aos antimicrobianos cloranfenicol, amoxicilina+clavulanato de potássio e azitromicina foi realizada através da técnica de disco-difusão. Linhagens de *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Haemophilus* e *Pseudomonas* apresentaram resistência ao antibiótico amoxicilina+clavulanato de potássio. Para *Pseudomonas*, foi possível observar resistência ao antibiótico cloranfenicol, enquanto que para azitromicina, obtivemos resultados discretos de resistência frente aos isolados *Escherichia coli* e *Pseudomonas*. Os resultados indicam que animais de estimação como os cães podem ser fontes de micro-organismos potencialmente patogênicos ao homem e que apresentam resistência á antibióticos comerciais, enfatizando assim, a necessidade de se manter certa cautela na convivência com estes animais.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, azitromicina, cloranfenicol, amoxicilina + clavulanato de potássio, animais domésticos.

GERKE, Lígia Abboud **RESISTANCE TO ANTIMICROBIANS FROM DOGS SALIVA BACTERIA FROM FOZ DO IGUAÇU CITY**. 2019. 46. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

ABSTRACT

The presence of pets in Brazilian homes is a practice that is increasing. Dogs, are considered animals that are in close contact with their owners, consequently are potential transmitters of many diseases as well as possible microorganisms resistant to certain commercial antibiotics. Bacteria of the genus *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Moraxella*, *Bacillus*, as well as the Enterobacteriaceae family, were found in dogs' oral microbiota, according to some studies. Within these genera there are bacteria pathogenic to humans, and their presence in dog saliva is a risk to both canine and human health. Knowledge of the presence of clinically important bacteria associated with domestic animal saliva may represent a strategy for assessing the risks of human contamination. This study aimed to evaluate the antimicrobial resistance of bacteria isolated from the saliva of domestic dogs. From 7 saliva samples, 12 bacterial strains of the genera *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* and *Enterococcus* were isolated using selective culture media. Antimicrobial resistance to chloramphenicol, amoxicillin + potassium clavulanate and azithromycin was performed using the disc diffusion technique. *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Haemophilus* and *Pseudomonas* showed resistance to the antibiotic amoxicillin + potassium clavulanate. For the *Pseudomonas* isolate, it was possible to observe resistance to the chloramphenicol antibiotic, while for azithromycin, we obtained discreet resistance results against the *Escherichia coli* and *Pseudomonas* isolates. The results indicate that pets such as dogs may be sources of potentially pathogenic microorganisms to humans and can be resistant to commercial antibiotics, thus emphasizing the need to be cautious in living with these animals.

Keywords: Bacterial resistance, azithromycin, chloramphenicol, amoxicillin + potassium clavulanate, domestic animals.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. PRINCIPAIS GÊNEROS BACTERIANOS PATOGÊNICOS	10
2.1.1. <i>Staphylococcus</i>	10
2.1.2. <i>Corynebacterium</i>	10
2.1.3. <i>Streptococcus</i>	12
2.1.4. <i>Neisseria</i>	12
2.1.5. <i>Bacillus</i>	12
2.1.6. Família <i>Enterobacteriaceae</i>	13
2.1.7. <i>Pseudomonas</i>	14
2.1.8. <i>Haemophilus</i>	14
2.1.9. <i>Enterococcus</i>	14
2.2. COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS	14
2.2.1. Mecanismos de Ação	15
2.2.2. Resistência a Antibióticos	17
3. JUSTIFICATIVA	20
4. OBJETIVOS	20
4.1. OBJETIVO GERAL	20
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1. COLETA DE AMOSTRAS	21
5.2. CULTURA E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	21
5.3.1. Ágar chocolate	23
5.3.2. Ágar sangue	23
5.3.3. Ágar CLED	23
5.3.4. Ágar S-S	23
5.3.5. <i>Yersinia</i>	24
5.3.6. Ágar MacConkey	24
5.4. TESTE DE ANTIBIOGRAMA	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6.1 GÊNEROS BACTERIANOS ISOLADOS	26
6.2 TESTE ANTIBIOGRAMA	31
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
8. REFERÊNCIAS	37
ANEXO I	46

1. INTRODUÇÃO

Comunidades microbianas podem atuar de forma simbiótica, fazendo com que haja uma colaboração entre as células, o que irá contribuir para seu bom funcionamento e equilíbrio, podendo inibir potenciais grupos microbianos indesejáveis a esta associação. Essa população de micro-organismos é chamada de “microbiota normal”, e pode diferir de acordo com os diferentes indivíduos em sua vasta gama de habitats (MADIGAN *et al.*, 2016; SILVA e SILVA, 2014). A população microbiana de um mesmo organismo se altera de acordo com as regiões do corpo do hospedeiro e suas funções, sendo as condições químicas e físicas de cada região seletivas para micro-organismos distintos. (MADIGAN *et al.*, 2016).

Pelo contato muito próximo entre cães e seus donos, esses animais de estimação podem ser potenciais transmissores de doenças e micro-organismos ao homem. Por esse contato íntimo, estudos demonstraram que as comunidades microbianas da pele de humanos podem ser afetadas pelo contato contínuo com o cão (SILVA; SILVA, 2014). Bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria* e *Actinomyces*, fazem parte da microbiota oral humana (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005), e foram encontrados também na microbiota oral dos cães, segundo os estudos feitos por Silva e Silva (2014), Bailie, Stowe e Schmitt (1978) e Elliot *et al.* (2005).

Com o demasiado uso de antibióticos, frequentemente de forma indiscriminada, tem-se o surgimento de micro-organismos resistentes. Nos últimos 80 anos aproximadamente, os genes que proporcionam resistência aos micro-organismos têm sido selecionados, através do uso humano, veterinário e até agrícola de antibióticos. Como consequência, não somente indivíduos resistentes, mas também linhagens desses micro-organismos foram selecionadas (MADIGAN *et al.*, 2016), dificultando o tratamento de infecções e elevando os casos de morte (MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, 2012).

Com o intuito de implantar o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNR), o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) teve sua inauguração no ano de 1999 em Foz do Iguaçu, visto que a cidade vivenciava uma epizootia de raiva e epidemias de outras doenças como malária e dengue (CCZ, 2019). Com a posterior transferência dos servidores públicos da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), o CCZ pôde então ampliar seus serviços, podendo então atuar no controle da dengue, malária, febre

amarela, leishmaniose visceral canina, entre outras zoonoses e no controle de roedores e animais peçonhentos (CCZ, 2019).

O CCZ da cidade de Foz do Iguaçu, atualmente atua em conjunto com a comunidade e outras instituições, no intuito de vigiar, prevenir e controlar zoonoses, doenças zoonóticas e também acidentes envolvendo animais peçonhentos. Esse objetivo é alcançado através da manipulação e controle de populações animais e do ambiente, de acordo com os critérios impostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), Ministério da Saúde (MS) e pela Secretaria Estadual da Saúde do Paraná (SESA-PR) (CCZ, 2019).

O CCZ auxilia em vários trabalhos acadêmicos, fornecendo informações e amostras. Trabalhos como o de Góis (2017), que teve como objetivo a investigação de arbovírus em mosquitos na cidade de Foz do Iguaçu; de Fortes (2010), que cujo alvo foi a pesquisa por animais sentinelas infectados pela febre maculosa brasileira, causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, em duas cidades brasileiras (São José dos Pinhais e Foz do Iguaçu); de Dias et al. (2018) que teve por objetivo a investigação da presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp., em cães da cidade de Foz do Iguaçu; entre outros, são exemplos da colaboração dessa instituição para a pesquisa acadêmica e avanços tecnológicos na área da saúde humana e animal.

Assim, através da colaboração do Centro de Controle de Zoonoses, o presente trabalho teve por objetivo a identificação da possível presença de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos na saliva de cães da cidade de Foz do Iguaçu as quais oferecem risco aos seus donos pelo contato próximo existente entre os mesmos. As informações obtidas pelo referente trabalho podem auxiliar na prevenção de infecções graves causadas por possíveis micro-organismos resistentes, auxiliando no processo de conscientização da sociedade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRINCIPAIS GÊNEROS BACTERIANOS PATOGÊNICOS

O termo infecção é definido pela multiplicação de bactérias (ou outro micro-organismo) no organismo hospedeiro. Já a doença é caracterizada pela expressão de efeito patogênico pela instalação do micro-organismo, gerando manifestações clínicas. Bactérias que fazem parte da microbiota normal do hospedeiro apresentam baixa patogenicidade, mas podem apresentá-la dependendo das condições do organismo (utilização de imunossupressores e antibióticos, câncer, entre outros). Portanto, a patogenicidade e as manifestações clínicas dependem não somente do micro-organismo em si, mas também de condições fornecidas pelo organismo do hospedeiro (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Haemophilus* foram encontrados na saliva de cães pelos estudos de Silva e Silva (2014), Bailie, Stowe e Schmitt (1978) e Elliot *et al.* (2005), enquanto do gênero *Enterococcus* foram encontradas na boca de cães por Tavares (2014). As principais doenças causadas por micro-organismos desses gêneros bacterianos podem ser observadas na tabela 1.

2.1.1. *Staphylococcus*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são gram-positivas, anaeróbias facultativas e catalase positivas. São micro-organismos comuns em animais e seres humanos, podendo não ser patogênicos, como *Staphylococcus epidermidis*, ou patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, muito associada a furúnculos, acne, infecções piogênicas (formadoras de pus), pneumonia, síndrome do choque tóxico, osteomielite, meningite e artrite. A maioria das infecções causadas por esse gênero é causada por bactérias da microbiota normal de um indivíduo infectado, mas assintomático, que as transfere a outro indivíduo. Certas infecções também podem ser decorrentes da ingestão de alimentos contaminados (MADIGAN *et al.*, 2016).

2.1.2. *Corynebacterium*

O diverso grupo de bactérias do gênero *Corynebacterium* possui organismos bacilares gram-positivos, patogênicos de animais e plantas, sendo um dos principais patogênicos para os seres humanos a *Corynebacterium diphtheriae*, causadora da

difteria, uma doença respiratória grave que ocorre usualmente em crianças (MADIGAN *et al.*, 2016).

Tabela 1: Principais gêneros bacterianos e doenças a eles relacionadas

Gênero	Principais doenças
<i>Staphylococcus</i>	Pneumonia, furúnculos, osteomielite, meningite, artrite, acne, etc (<i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>).
<i>Streptococcus</i>	Infecções pulmonares, na pele, orais em geral, cáries, faringite, mastite, otite (<i>S. pyogenes</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. viridans</i> e <i>S. pneumoniae</i>).
<i>Neisseria</i>	Meningite e gonorreia (<i>N. meningitidis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>).
<i>Bacillus</i>	Antraz cutâneo, gastrointestinal e pulmonar e intoxicação alimentar (<i>B. anthracis</i> e <i>B. cereus</i>).
<i>Corynebacterium</i>	Difteria (<i>C. diphtheriae</i>).
Família <i>Enterobacteriaceae</i>	Infecções intestinal e urinária, meningite, etc (<i>Escherichia coli</i>); Gastroenterites, febre tifoide (<i>Salmonella 11ntérica</i>).
<i>Pseudomonas</i>	Infecções na pele (queimaduras, ferimentos), olhos, ouvidos, pneumonia hospitalar (<i>P. aeruginosa</i>).
<i>Haemophilus</i>	Meningite, artrite, osteomielite, conjuntivite e cancroide (<i>H. influenzae</i> , <i>H. aegyptius</i> , <i>H. ducreyi</i>).
<i>Enterococcus</i>	Infecções urinárias, de feridas, bacteremia (<i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>).

Fonte: MADIGAN *et al.* (2016), formatada pelo autor

2.1.3. *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* possui bactérias gram-positivas, catalase negativas e produtoras de ácido láctico, as quais possuem importância na produção de silagem, e outros produtos fermentados. Esse gênero é dividido em dois grupos com espécies relacionadas: a) o grupo *pyogenes*, representado por *Streptococcus pyogenes*, responsável por infecções de garganta, e b) o grupo *viridans*, as quais seus integrantes são prevalentes na cavidade oral, representado por *Streptococcus mutans*, agente causador de cáries dentárias e *Streptococcus viridans*, causador de infecções orais, que pode inclusive gerar complicações neurológicas devido à proximidade anatômica entre a mucosa oral e o sistema nervoso central (MADIGAN *et al.*, 2016; PEGADO, 2010). *Streptococcus pyogenes* é o agente responsável pela faringite estreptocócica, mas pode causar também outros tipos de infecções, como mastite (glândulas mamárias), otite (orelha interna) e impetigo (pele). Algumas linhagens de estreptococos produzem exotoxinas, geradoras da maior parte dos sintomas da escarlatina e da síndrome do choque tóxico estreptocócico. Outra espécie importante é a *Streptococcus pneumoniae*, causadora de infecções pulmonares, que podem se desenvolver a outros distúrbios respiratórios (MADIGAN *et al.*, 2016).

2.1.4. *Neisseria*

O gênero *Neisseria* contém bactérias de morfologia coco, gram-negativas, muito comum em animais. Entretanto, algumas espécies são causadoras de importantes patologias, como *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*. A *Neisseria meningitidis* é um dos causadores da meningite, provocando inflamação das membranas que revestem o cérebro. A gonorreia, doença sexualmente transmissível, é provocada pela *Neisseria gonorrhoeae*. Visto que essas bactérias não são capazes de sobreviver fora das membranas mucosas (faringe, reto, trato geniturinário, conjuntiva) e são, sensíveis à exposição ao sol, radiação ultravioleta e dessecação, sua transmissão se restringe somente pelo contato íntimo entre indivíduos (MADIGAN *et al.*, 2016).

2.1.5. *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, gram-positivas, encontradas principalmente no solo, inclusive as espécies patogênicas

para humanos e outros animais. Tem-se como exemplos a *Bacillus thuringiensis* (causadora de doença fatal a vários grupos de insetos), *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*. A *Bacillus anthracis* possui propriedades que permitem sua utilização como arma biológica e atos de bioterrorismo. Pode causar 3 formas de doença: antraz cutâneo (contraída pela pele lesionada, a qual foi contaminada com esporos), antraz gastrointestinal (contraído pelo consumo de plantas ou carcaças de animais contaminadas pelos endósporos) e antraz pulmonar (contraído através da inalação dos endósporos). A inalação desses endósporos ou de bactérias vivas pode ocasionar infecções pulmonares, causando inclusive hemorragia pulmonar e cerebral. Outra espécie é o *Bacillus cereus*, causadora de um número não muito significativo de casos de intoxicação alimentar, os quais as enterotoxinas produzidas geram sintomas como náuseas, vômitos, diarreia e dor gastrointestinal (MADIGAN *et al.*, 2016).

2.1.6. Família *Enterobacteriaceae*

Muitos micro-organismos patogênicos são encontrados na família *Enterobacteriaceae*, os quais os principais estão envolvidos em infecções hospitalares em diversos países (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005), enquanto outras são de interesse industrial (MADIGAN *et al.*, 2016). A *Escherichia coli* faz parte dessa família e está presente na microbiota intestinal de seres humanos e outros animais. Bacilares e gram-negativas, são capazes de causar diversos tipos de infecções, como intestinal, urinária, meningite e outras (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Também fazem parte desta família as bactérias bacilares gram-negativas do gênero *Salmonella*. Quase sempre patogênicas para humanos e outros animais, são transmitidas a partir da ingestão de alimentos contaminados, bem como pelo manuseio de produtos animais ou os próprios animais contaminados. Como espécies desse gênero habitam o intestino de animais de sangue quente e frio, é comum encontrá-las em esgotos, o que pode acarretar em transmissão destas através da água, como a febre tifoide. Esta última e as gastroenterites são as doenças mais comuns em humanos. A salmonelose mais comum é causada pela bactéria *Salmonella enterica*, que se subdivide em sete subespécies. Destas, a *Salmonella enterica* sorovar *typhi*, é a causadora da febre tifoide, a qual é endêmica em áreas onde o saneamento básico é precário ou inexistente. Essa doença pode acarretar complicações, como hemorragia e perfuração intestinal, e possivelmente choque séptico, podendo ser fatal (MADIGAN *et al.*, 2016; D'AOUST; MAURER, 2007).

2.1.7. *Pseudomonas*

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são bacilares e gram-negativas, atuantes como patógenos oportunistas e podem ser encontradas facilmente no ambiente, pela sua capacidade de utilizar variadas fontes de energia. A espécie patogênica mais importante é a *Pseudomonas aeruginosa*, que pode causar infecções na pele, por ferimentos e queimaduras, nos pulmões em pacientes com fibrose cística e pneumonia hospitalar, bem como nos olhos em usuários de lentes de contato e ouvidos (LYCZAK; CANNON e PIER, 2000; FERRAREZE et al., 2007; MADIGAN et al., 2016).

2.1.8. *Haemophilus*

Gram-negativas e cocobacilares, as bactérias do gênero *Haemophilus* são abundantes na microbiota oral de humanos. Entretanto, dentro desse gênero tem-se a espécie *Haemophilus influenzae*, o patógeno mais importante do ponto de vista clínico. Este é um dos três causadores da meningite, bem como outras infecções locais, como artrite, osteomielite, epiglote e outros. Tem-se outras espécies patogênicas como *Haemophilus aegyptius*, causadora de conjuntivite; *Haemophilus ducreyi*, causadora da doença cancróide e outros (KILIAN, 2015; MADIGAN et al., 2016).

2.1.9. *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* é encontrado no solo, água, mucosa de humanos e animais, plantas, entre outros. É composto por bactérias gram-positivas, que podem ser agentes patogênicos oportunistas, principalmente em pacientes com doenças graves ou imunocomprometidos. Podem causar infecções urinárias, infecções de feridas (cirúrgicas, queimaduras ou úlceras), bacteremia, estando também associadas a endocardites e infecções pélvicas e intra-abdominais. Mais raramente, podem causar infecções respiratórias e no sistema nervoso central. As espécies mais frequentemente isoladas clinicamente de humanos são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (TEIXEIRA; MERQUIOR, 2013).

2.2. COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

Antibióticos são compostos produzidos naturalmente por fungos e bactérias, capazes de inibir o crescimento ou até causar a morte de micro-organismos, e que, aparentemente, atuam da mesma forma na natureza e em sua utilização clínica

(GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Mesmo havendo milhares de antibióticos conhecidos, somente 1% é utilizado clinicamente, devido à sua toxicidade ou ineficiência na captação pelas células alvo. Esses antibióticos naturais são frequentemente alterados artificialmente de forma a aumentar sua eficácia, sendo então chamados de antibióticos semissintéticos (MADIGAN *et al.*, 2016).

Esses medicamentos são separados em classes de acordo com o mecanismo de ação apresentado. As principais classes de antibióticos utilizadas clinicamente são β -lactâmicos (como amoxicilina, cefalosporinas), tetraciclinas, aminoglicosídeos (como gentamicina), macrolídeos (como azitromicina), cloranfenicol, glicopeptídeos, entre outros (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Já no uso veterinário em pequenos animais, amoxicilina com clavulanato, cefalosporinas, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas e trimetoprimasulfonamidas são os principais utilizados (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010).

Os antibióticos β -lactâmicos, como a amoxicilina, apresentam amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e ótimo perfil de segurança, compondo a primeira classe derivada de produtos naturais utilizada no tratamento de infecções bacterianas. Mesmo após muitos anos se passarem da descoberta da penicilina, os agentes mais comumente utilizados fazem parte desta classe de medicamentos. Os antimicrobianos de segunda geração da classe dos macrolídeos, como azitromicina, foram gradualmente substituindo o uso da eritromicina, com melhor espectro de atividade (apresentando amplo espectro de ação e maior atividade contra gram-negativas), melhor atividade, atenuação de efeitos colaterais, entre outras melhorias (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010). Já o cloranfenicol, um clássico antibiótico de amplo espectro, produzido por bactérias do gênero *Streptomyces*. Atualmente sua utilização não é de primeira eleição pela sua toxicidade, sendo então utilizado quando a atividade da primeira opção medicamentosa escolhida não é satisfatória (MORALES G.; HERRERA; MUÑOZ; 2007).

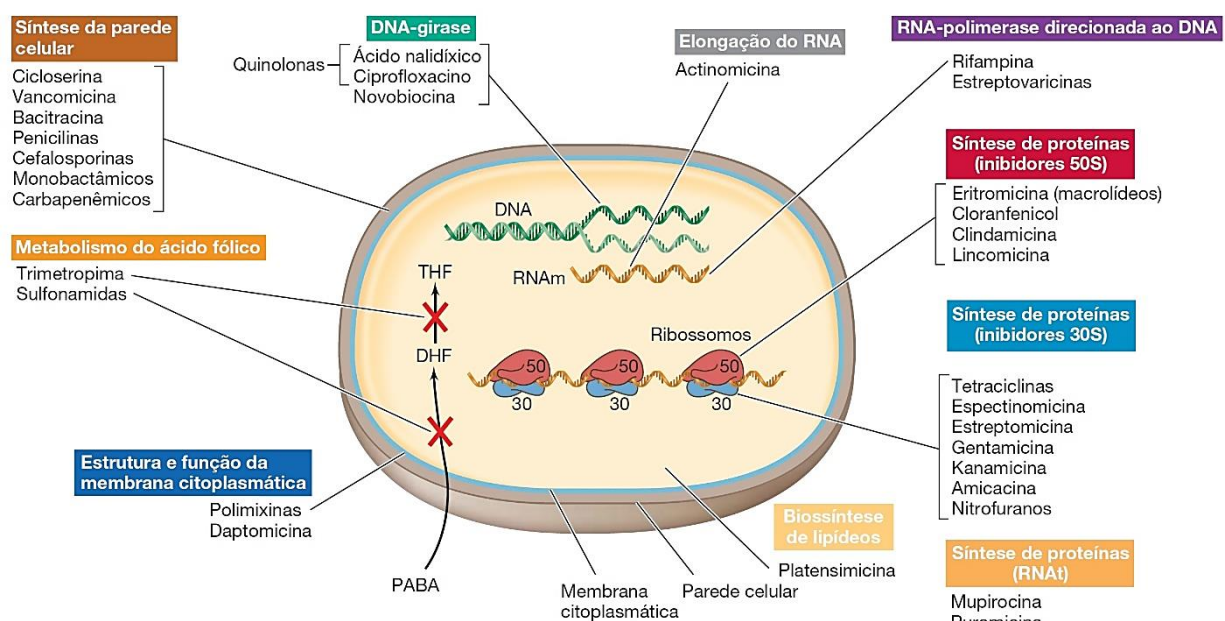
2.2.1. Mecanismos de Ação

Cada classe de antibiótico possui um espectro de ação, a qual define a sua especificidade mediante aos micro-organismos que serão atingidos e os que serão resistentes ao seu efeito. O Gram das bactérias, que está relacionado à estrutura da parede celular das mesmas, tem alta influência na susceptibilidade destas aos antibióticos, tendo-se antimicrobianos de pequeno espectro, que atingem somente

bactérias gram-negativas ou gram-positivas, e os de amplo espectro, a qual atingem ambos os grupos, e são utilizados clinicamente de forma mais frequente (MADIGAN *et al.*, 2016).

Pode-se observar na figura 1 alguns mecanismos de ação de antibióticos em bactérias. Existem antibióticos que atuam na inibição da síntese proteica do micro-organismo, como o cloranfenicol e a azitromicina, que interrompem a tradução por interações com os ribossomos, enquanto outros inibem a transcrição, através da inibição da síntese de RNA, como a rifamicina. Já os conhecidos como β -lactâmicos, como a amoxicilina, atuam inibindo a síntese da parede celular. Outros antibióticos podem ocasionar a despolarização da membrana celular, através de uma ligação específica à membrana formando um poro, como a daptomicina. Por conta da despolarização, a célula perde a capacidade de sintetizar macromoléculas, ocasionando sua morte. A platensimicina é o primeiro integrante de uma classe diferencial de antibióticos, que atua na inibição da biossíntese de ácidos graxos, e assim, também a produção de lipídeos. Tem-se também antibióticos, como as sulfonamidas, que atuam inibindo a síntese de ácido fólico pela bactéria, impedindo assim que esta faça a síntese de ácidos nucleicos. Esse medicamento é efetivo pois as bactérias fazem a síntese do próprio ácido fólico, enquanto nós humanos e a maioria dos animais obtemos este a partir da dieta (MADIGAN *et al.*, 2016; CAETANO, 2016).

Figura 1 – Mecanismos de ação de antibióticos



Fonte: Madigan et al. (2016)

2.2.2. Resistência a Antibióticos

O desenvolvimento de resistência bacteriana não é causado pelos antimicrobianos, mas pela seleção que estes acabam por fazer. A utilização desses medicamentos apenas seleciona os indivíduos resistentes, que sofreram mutações espontaneamente. Assim, a resistência pode surgir tanto através de mutações espontâneas como pela aquisição de DNA de fonte externa. Essa aquisição pode ser através da transformação, transdução ou conjugação, sendo essa última a mais importante, visto que é a transferência de DNA entre células vivas. A disseminação de plasmídeos através da conjugação foi um dos maiores responsáveis do desenvolvimento de resistência á antibióticos em bactérias (SEFTON, 2002).

Existem vários mecanismos as quais as bactérias podem adquirir para que se tornem resistentes aos antibióticos, os quais diferem de acordo com o tipo de antibiótico e sua forma de atuação (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; MADIGAN *et al.*, 2016). Assim, as bactérias podem, por exemplo, promover a alteração do alvo de ligação do antibiótico, como alteração das PBPs (alvos de ação da penicilina, *Penicillin Binding Proteins*) ou alteração de proteína de uma subunidade do ribossomo alvo, através da mutação ou por aquisição de plasmídeo. Podem também promover a ligação de uma proteína ao próprio ribossomo, bloqueando a interação deste com o fármaco ou sofrer mutações em genes codificadores da DNA girase e topoisomerase IV, diminuindo sua afinidade com o antibiótico (CASTANHEIRA, 2013).

Outro mecanismo é a produção de enzimas que inativam o fármaco, como β -lactamases (clivam o anel β -lactâmico por hidrólise, impedindo sua ligação às PBPs) para antibióticos β -lactâmicos; as N-acetiltransferases (AAC - modificam o grupo amino), O-nucleotidil-transferases (ANT) ou O-fosfotransferases (APH) (ambos quebram as ligações no grupo hidroxilo) para antibióticos aminoglicosídeos; cloranfenicol-acetiltransferase (hidrolisa o grupo amida e modifica os grupos hidroxilos) para o antibiótico cloranfenicol; ou enzimas esterases e fosfotransferases, que inativam antibióticos macrolídeos (CASTANHEIRA, 2013).

Além destes, a diminuição de permeabilidade da membrana por mutações ou modificações nas porinas, também é um mecanismo ocorrente, diminuindo a susceptibilidade da bactéria ao fármaco. Não menos importantes, as bombas de efluxo também são um recurso muito utilizado, originadas por mutação gênica a qual aumenta a síntese de proteínas que as compõem, transportando o agente antimicrobiano para fora da célula e restringindo sua ação. (CASTANHEIRA, 2013).

Em relação ao cloranfenicol, o principal mecanismo de resistência é a sua inativação através da acetilação, mediada pela enzima cloranfenicol acetil transferase (CAT) (MURRAY; SHAW, 1997). Segundo Mosher *et al.* (1995), tem-se também como alternativa possível de resistência, a presença de uma ORF que codifica uma proteína de efluxo para 3-fosfo-Cloranfenicol, que atua na presença de cloranfenicol 3'-O-fosfotransferase facilitando o efluxo de antibiótico inativado.

Como mecanismos de inibição para amoxicilina, tem-se predominantemente a produção de β -lactamase, que pode ser "contornada" através da combinação do medicamento a inibidores desta enzima, como ácido clavulânico. Mas, há registros de β -lactamases codificadas por plasmídeos que apresentam sensibilidade reduzida a estes inibidores (STAPLETON *et al.*, 1995; SEFTON, 2002). De Francesco *et al.* (2011) comenta que mutações em genes codificadores de "porina" podem resultar em super-regulação ou sub-regulação frente à exposição a antibióticos, alterando a permeabilidade da membrana e conferindo resistência à bactéria.

A resistência a antibióticos do grupo dos macrolídeos (como azitromicina) pode ser adquirida através de uma alteração no ribossomo, impedindo ou diminuindo sua ligação ao medicamento, como uma mutação na peptidiltransferase que confere resistência de alto nível a azitromicina, a alteração de um dos resíduos de adenina no RNAr conferindo resistência a eritromicina, entre outros (ENGBERG *et al.*, 2001; CHISHOLM; DAVE; ISON, 2010).

No Hospital Estadual Sumaré (HES) - São Paulo, em 2007/2008, de 862 óbitos, 133 (15,4%), foram associados à infecção hospitalar. Das infecções ocorrentes neste hospital (com e sem óbito), a mais frequente foi a de corrente sanguínea, seguida de pneumonias (principalmente em maiores de 60 anos), infecções do trato urinário, e do sítio cirúrgico (menos frequente). Nessas infecções, os principais micro-organismos causadores foram *Staphylococcus aureus* (ou outras espécies), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Providencia stuartii* e outras (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Já em um hospital universitário em Fortaleza – Ceará, ao longo de um ano (janeiro a dezembro de 2007) foram identificados 516 casos de infecção hospitalar (NOGUEIRA *et al.*, 2009). Destes, Nogueira *et al.* (2009) afirma que 1/3 poderiam ser evitados, através de medidas de precauções. Em 1994, um estudo realizado no Brasil avaliou 8.624 pacientes com mais de 24 horas de internação, identificando 1.129 pacientes com infecção hospitalar (aproximadamente 13%). Mesmo com a escassez de dados e atualizações

relacionados a esses ocorridos, as infecções hospitalares representam uma das principais causas de morte no Brasil, juntamente a doenças cardiovasculares, respiratórias, entre outras (NOGUEIRA *et al*, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou, em um manual publicado em 2018, algumas estratégias de implementação em hospitais visando o combate da ameaça crescente de resistência microbiana a antibióticos. Foi sugerida a implantação de um programa de gerenciamento do uso de antimicrobianos, definido pela OMS como "Antimicrobial Stewardship Program (ASP)". Esse programa consiste em um conjunto de intervenções coordenadas, de forma a melhorar e gerenciar o uso de antibióticos de forma adequada, prevenindo ou retardando o surgimento de resistência antimicrobiana e a transmissão de micro-organismos patogênicos resistentes, atuando em conjunto com medidas de prevenção e controle de infecção. Para que haja sucesso é recomendada a nomeação de um time gestor contendo integrantes interdisciplinares e um time operacional para elaborar, executar e monitorar as ações do programa. Outra variável muito importante e crucial para o sucesso desse programa de gerenciamento é a educação e conscientização tanto dos profissionais da saúde, quanto dos cuidadores, acompanhantes e pacientes, ressaltando os cuidados necessários na utilização desses medicamentos, bem como a importância da responsabilidade em sua utilização no desenvolvimento de resistência microbiana. Dentro deste programa também são desenvolvidas ações para melhora da prescrição de antimicrobianos, através do desenvolvimento de protocolos clínicos, readequação da terapia de acordo com resultados microbiológicos, análise técnica das prescrições pela farmácia, entre outras (PAHO, 2018; ANVISA, 2017).

3. JUSTIFICATIVA

Analisando o contato frequente entre cães e humanos, mostra-se importante o conhecimento da população microbiana existente na saliva desses animais, permitindo a avaliação dos riscos que esse contato pode refletir tanto na saúde humana, quanto canina (SILVA; SILVA, 2014).

Em decorrência do uso excessivo e indiscriminado de antibióticos pelos seres humanos, o surgimento de micro-organismos resistentes a estes medicamentos é acelerado. Essa resistência não é produzida pelos antibióticos em si, mas pela ação seletiva que estes proporcionam, selecionando os micro-organismos detentores de mecanismos que possibilitem sua sobrevivência frente à ação desses medicamentos. Assim, faz-se necessário o teste de resistência a antibióticos de patógenos isolados, para que em caso de infecção, um tratamento efetivo possa ser assegurado (MADIGAN *et al.*, 2016).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Isolamento, identificação e avaliação da resistência a antibióticos de bactérias presentes na saliva de cães domésticos em Foz do Iguaçu.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de saliva de cães domésticos no CCZ;
- Isolar bactérias presentes na saliva canina;
- Identificar possíveis bactérias de importância clínica;
- Avaliar a resistência das linhagens microbianas de importância clínica frente aos antibióticos comerciais amoxicilina + clavulanato de potássio, cloranfenicol e azitromicina;
- Fornecimento de informações para o CCZ, de forma que este possa elaborar estratégias de prevenção e contenção da disseminação das bactérias identificadas e resistentes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. COLETA DE AMOSTRAS

A coleta das 7 amostras de saliva dos animais foi realizada nas instalações do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Foz do Iguaçu. Os animais utilizados foram cães domésticos, os quais foram levados ao CCZ por seus respectivos donos, com a finalidade da coleta de sangue, realizada pelos servidores do CCZ, para realização do teste de leishmaniose canina. Assim, aproveitando o manejo do animal (contenção), a coleta da saliva foi realizada utilizando um swab estéril contendo o meio de cultivo Stuart (1 g.L^{-1} tioglicolato de sódio, 10 g.L^{-1} glicerofosfato de sódio, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ cloreto de cálcio, $0,002 \text{ g.L}^{-1}$ azul de metileno, $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ ágar), o qual preserva os micro-organismos por um período de até 48 horas.

Informações referentes ao animal (nome, idade, peso, entre outros dados) foram coletadas pelo CCZ para controle interno sobre as condições dos animais. Foi apresentado um termo de consentimento (anexo I) ao dono do cão, para que este assinasse e assim permitisse a coleta da amostra de saliva de seu cão para realização deste trabalho. O indivíduo e seu cão foram conduzidos até uma sala na presença de um servidor do CCZ, onde o dono colocou o animal em uma mesa, e o cão teve sua boca imobilizada com o auxílio de uma bandagem (sem machucá-lo), de forma a proteger o servidor durante a coleta de sangue (de acordo com o procedimento padrão seguido pelo CCZ). Após a coleta de sangue, foi coletada a saliva do cão com o swab estéril. Os swabs utilizados foram acondicionados em uma caixa de isopor com gelo e então levados ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Biotecnologia Ambiental (LEPBioAmb) da UNILA para processamento.

5.2. CULTURA E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Para realização do isolamento das bactérias da saliva dos cães, foram preparadas 6 placas de Petri com os meios de cultura diferenciais para cada amostra coletada: *i)* ágar chocolate: $7,5 \text{ g L}^{-1}$ peptona de caseína, $7,5 \text{ g L}^{-1}$ peptona de carne, $1,0 \text{ g L}^{-1}$ amido de milho, $4,0 \text{ g L}^{-1}$ fosfato dipotássico, $1,0 \text{ g L}^{-1}$ fosfato monopotássico, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ cloreto de sódio, $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ágar, 5% sangue; *ii)* ágar sangue: $10,0 \text{ g L}^{-1}$ peptona de caseína, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ peptona de carne, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ extrato de levedura, $3,0 \text{ g L}^{-1}$ infuso de carne, $1,0 \text{ g L}^{-1}$ amido de milho, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ cloreto de sódio, $13,5 \text{ g L}^{-1}$ ágar e 5% sangue; *iii)* ágar Cled: $4,0 \text{ g L}^{-1}$ peptona de caseína, $4,0 \text{ g L}^{-1}$ peptona de gelatina,

3,0 g /L⁻¹ extrato de carne, 10,0 g L⁻¹ lactose, 0,128 g L⁻¹ L-cistina, 15,0 g L⁻¹ ágar e 0,02 g L⁻¹ azul de bromotimol; iv) ágar S-S: 2,5 g L⁻¹ peptona de caseína, 2,5 g L⁻¹ peptona de carne, 5,0 g L⁻¹ extrato de carne, 8,5 g L⁻¹ sais biliares, 10,0 g L⁻¹ lactose, 8,5 g L⁻¹ citrato de sódio, 1,0 g L⁻¹ citrato férrico amoniacal, 8,5 g L⁻¹ tiosulfato de sódio, 0,025 g L⁻¹ vermelho neutro, 0,0033 g L⁻¹ verde brilhante, e 13,5 g L⁻¹ ágar; v) *Yersinia*: 17,0 g L⁻¹ peptona de gelatina, 1,5 g L⁻¹ peptona de caseína, 1,5 g L⁻¹ peptona de carne, 2,0 g L⁻¹ extrato de levedura, 20,0 g L⁻¹ manitol, 0,5 g L⁻¹ deoxicolato de sódio, 0,5 g L⁻¹ colato de sódio, 1,0 g L⁻¹ cloreto de sódio, 2,0 g L⁻¹ piruvato de sódio, 0,01 g L⁻¹ sulfato de magnésio, 0,03 g L⁻¹ vermelho neutro, 0,001 g L⁻¹ cristal violeta, 0,004 g L⁻¹ triclosan e 13,5 g L⁻¹ ágar; e vi) MacConkey: 1,5 g L⁻¹ Peptona de caseína, 1,5 g L⁻¹ Peptona de carne, 17,0 g L⁻¹ Peptona de gelatina, 1,5 g L⁻¹ Sais biliares (mistura), 10,0 g L⁻¹ Lactose, 5,0 g L⁻¹ Cloreto de sódio, 0,03 g L⁻¹ Vermelho neutro, 0,001 g L⁻¹ Cristal Violeta, 13,5 g L⁻¹ Ágar. Os meios foram preparados (de acordo com as normas de cada fabricante), autoclavados e vertidos em placas de Petri, com exceção dos meios ágar S-S e *Yersinia*, que não podem ser autoclavados, sendo então fervidos (LEVY, 2004).

Os swabs contendo as amostras foram então imersos em água peptonada 0,5%, e agitados em vórtex durante 30 segundos a 1 minuto para transferência das células para a solução (adaptado de: ANVISA, 2010). Utilizando essa solução sem nenhum tipo de diluição ou processamento, foram realizadas estrias de esgotamento utilizando o próprio swab em cada uma das placas.

As placas inoculadas contendo os meios ágar chocolate, ágar sangue e MacConkey foram colocadas em condições de microaeração, através da utilização de uma lata contendo uma vela, a qual foi acesa e a lata fechada. A vela acesa consome boa parte do oxigênio presente dentro da lata, proporcionando uma atmosfera diferenciada, não totalmente anaeróbia, permitindo o crescimento de bactérias aeróbias e facultativas. Essa lata foi colocada em estufa a 37°C, durante 48 a 72 horas juntamente às outras placas inoculadas contendo os meios ágar Cled, ágar S-S e *Yersinia* (fora da lata).

5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS

Após esse período, as linhagens foram analisadas e comparadas com informações referentes a cada meio de cultivo utilizado. Além da interpretação através

dos meios seletivos, foram utilizados a coloração de Gram e o teste da catalase para auxílio na identificação dos gêneros bacterianos.

Após identificação dos gêneros, as bactérias foram acondicionadas em meio de cultivo (repique contínuo), e armazenadas em geladeira a 4 °C.

5.3.1 Ágar chocolate

A cor original do meio é castanho escuro (chocolate). Colônias de tamanho pequeno a médio, com pigmento amarelo sugerem qualificação de *Neisseria* spp, *Branhamella* catarrhalis ou *Moraxella* spp., colônias pequenas e delicadas, com pigmento creme claro, sugerem qualificação de *Haemophilus* spp. (ANVISA, 2010).

5.3.2 Ágar sangue

A cor original do meio é vermelha. Se houver presença de halo transparente ao redor das colônias, significa que houve lise total dos eritrócitos, e sugere qualificação de *Streptococcus* spp. ou *Staphylococcus* spp., se houver a presença de halo esverdeado ao redor das colônias, significa que houve lise parcial dos eritrócitos e sugere a qualificação de *Streptococcus pneumoniae* ou *Streptococcus* do grupo *viridans*, e se houver a ausência de halo ao redor das colônias sugere ausência de micro-organismos hemolíticos (ANVISA, 2010).

5.3.3 Ágar CLED

A cor original do meio é azul claro. Colônias de cor amarela sugerem qualificação de lactose positiva (as quais podem ser *Escherichia coli* fermentadora de lactose, *Klebsiella* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*), e colônias de cor azul sugere qualificação de lactose negativa (as quais podem ser *Escherichia coli* não fermentadora de lactose, *Proteus* spp., *Salmonella* spp. (ANVISA, 2010).

5.3.4 Ágar S-S

A cor original do meio é vermelho alaranjado. Colônias com centro negro ou incolores sugerem qualificação de *Salmonella*, colônias incolores sugerem qualificação de *Shigella* spp., colônias cor de rosa ou vermelhas sugerem qualificação de *Escherichia coli* ou *Klebsiella* spp., as bactérias não fermentadoras de lactose resultam

em colônias incolores, enquanto bactérias fermentadoras de lactose resultam em colônias cor de rosa (ANVISA, 2010).

5.3.5 *Yersinia*

A cor original do meio é laranja avermelhado médio a escuro ou roxo avermelhado ligeiramente turvo. Colônias translúcidas ou translúcidas com centro rosa escuro sugerem qualificação para *Yersinia enterocolitica* ou outras espécies desse gênero (NEOGEN, 2011).

5.3.6 Ágar MacConkey

Colônias vermelhas ou rosadas são formadas por bactérias fermentadoras de lactose, enquanto colônias incolores ou verdes são formadas por bastonetes gram-negativos (*Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*). Os sais biliares e o cristal violeta presentes no meio possuem atuação inibitória do crescimento de bastonetes Gram-positivos (MBIOLOG, 2010).

5.4. TESTE DE ANTIBIOGRAMA

As linhagens de importância clínica identificadas nos testes anteriores, foram submetidas a testes de resistência a antibióticos.

Cada linhagem identificada foi transferida de seu respectivo meio de isolamento para um tubo de ensaio com 3 mL de água destilada, sendo submetida ao vórtex por 10 segundos para homogeneização. Após homogeneização, foi utilizado um swab estéril, o qual foi embebido na solução de bactéria e aplicado em toda a área de placas contendo o meio de cultivo ágar Mueller Hinton - MH (17,5 g L⁻¹ peptona de caseína, 2,0 g L⁻¹ peptona de carne, 1,5 g L⁻¹ amido, 17,0 g L⁻¹ ágar), preparado segundo as instruções do fabricante. Foi utilizada uma placa para cada micro-organismo isolado e identificado anteriormente (LEVY, 2004).

Foram preparadas soluções de 3 antimicrobianos de amplo espectro: cloranfenicol 500 mg.L⁻¹, amoxicilina 500 mg + clavulanato de potássio 125 mg.L⁻¹, e azitromicina 500 mg.L⁻¹. Discos de filtro de papel (5 mm de diâmetro) foram esterilizados e embebidos nestas soluções e posicionados nas placas com as linhagens bacterianas inoculadas de acordo com a metodologia de difusão em disco descrita por Kirby-Bauer. Assim, para cada placa com o meio MH com uma bactéria

devidamente inoculada, foram posicionados 3 discos para cada antimicrobiano e 3 discos embebidos em Lysoform como controle. As placas as quais as bactérias foram isoladas dos meios incubados em microaeração foram incubadas de forma semelhante, em estufa a 37 °C durante 24 a 48 horas. O restante das placas contendo bactérias isoladas sem a utilização de microaeração, foram acondicionadas em estufa normalmente, a 37 °C durante 24 a 48 horas. Os halos de inibição formados ao redor dos discos foram medidos como ilustrado na figura 2 e analisados.

Figura 2: Exemplo de medição de halo



Fonte: Adaptado de Laborclin, 2011

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 GÊNEROS BACTERIANOS ISOLADOS

Primeiramente, cabe ressaltar o caráter qualitativo deste trabalho, cujo objetivo foi identificar a presença de gêneros bacterianos potencialmente patogênicos e clinicamente relevantes na saliva de cães. Sobre este aspecto, como apresentado na tabela 1, foi possível efetuar o isolamento dos seguintes gêneros nas 7 amostras coletadas: *Staphylococcus* e *Escherichia coli* da amostra 1, *Streptococcus* (Figura 4) da amostra 3, *Escherichia coli* e *Salmonella* da amostra 4, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Figura 3) da amostra 5, *Haemophilus* (Figura 4) e *Escherichia coli* (Figura 3) da amostra 6 e *Enterococcus* da amostra 7. Não foi possível isolar e identificar nenhum gênero da amostra 3. A identificação dos gêneros foi feita através dos meios seletivos descritos na referente tabela, bem como através da coloração de Gram e teste de catalase (apenas para confirmação em alguns casos).

A baixa quantidade de gêneros recuperada das amostras nos meios ágar sangue (01 *Streptococcus* da amostra 2); ágar chocolate (01 *Haemophilus* da amostra 2), e nenhum isolado dos meios ágar S-S e *Yersinia* pode ser explicada pelo ambiente de convívio do próprio animal amostrado, pois são animais domésticos, podendo assim, associar a ausência de isolados de gêneros clínicos (patogênicos) por estes viverem em um ambiente com boas condições sanitárias, sob bons cuidados, sem contato direto com alimentos estragados, lixo em geral, lixo hospitalar, bem como com fezes de outros animais contaminados. Visto que as amostras são derivadas de animais de locais diferentes, sob condições diferentes e possivelmente em contato com outros animais, tem-se uma justificativa para a diversidade de gêneros isolados entre as amostras.

Por outro lado, os meios de cultivos ágar MacConkey e CLED foram os que apresentaram uma maior quantidade de gêneros clínicos, entre eles *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Escherichia*, recuperados do meio MacConkey, e os gêneros *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Enterococcus*, recuperados do meio CLED. O meio de cultivo CLED (cistina lactose deficiente em eletrólitos) é um meio de cultura para diferenciação utilizado no isolamento e enumeração de agentes patogênicos, mas minimiza a proliferação indevida de espécies de *Proteus*, devido à ausência de eletrólitos, além de identificar organismos fermentadores de lactose com a redução do pH e alteração da cor do meio de verde para amarelo (Manual BD, 2012). Já o meio MacConkey, é um meio diferencial seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação

de *Enterobacteriaceae* e uma variedade de outros bastonetes gram-negativos e amostras clínicas. Assim, podemos dizer que nesses dois meios de cultivo utilizados, devido a suas composições, esperava-se realmente a recuperação de um número maior de gêneros bacterianos clínicos.

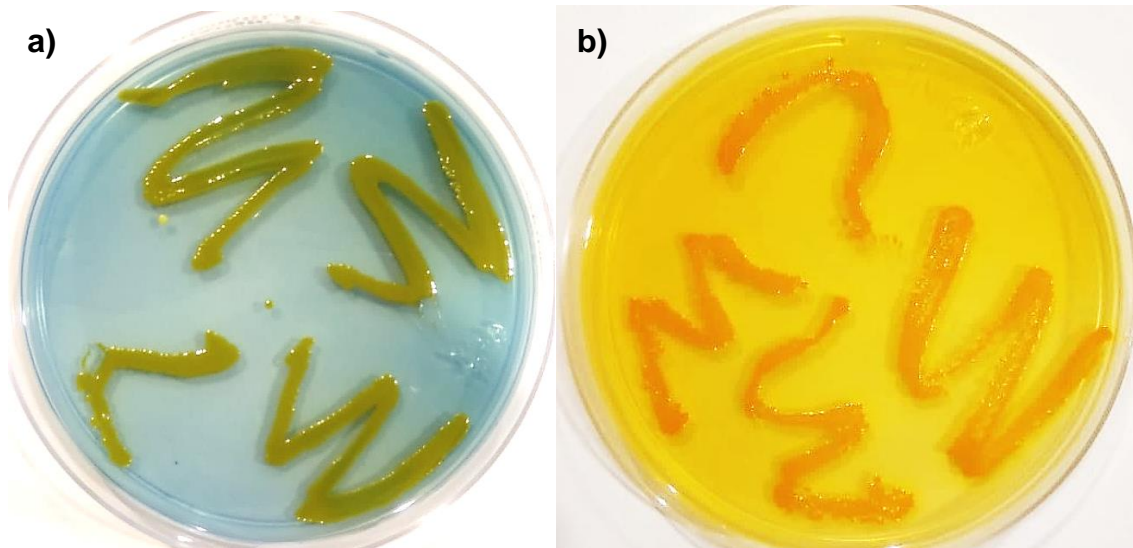
Entretanto, cabe ressaltar que, durante os isolamentos das bactérias das salivas dos 7 cães estudados, foram recuperadas, mas não isoladas e identificadas, várias outras linhagens bacterianas, mas como estas não apresentaram as características (coloração, hemólise e morfologia das colônias) de uma linhagem potencialmente clínica, descritas nos manuais de identificação utilizando os meios de cultivo diferenciais no presente estudo, as respectivas bactérias foram descartadas, justificando assim a pequena quantidade de isolados obtidos.

Os gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Haemophilus*, e *Streptococcus* também foram encontrados por Bailie, Stowe e Schmitt (1978) de amostras nasais e de saliva de cães, os quais, além destes, também encontraram gêneros como *Klebsiella*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Aeromonas* e outros. *Staphylococcus* e *Streptococcus* também foram encontrados por Elliot *et al.* (2005) em amostras de saliva canina e Ramos *et al.* (2011) em amostras sanguíneas de cães. Elliot *et al.* (2005) encontraram além destes, os gêneros *Actinomyces*, *Neisseria*, *Granulicatella* e outros em seu trabalho. Tavares (2014) também isolou bactérias do gênero *Enterococcus* da boca e coração de cães, identificando as espécies em nível molecular. Jay-Russell *et al.* (2014) isolaram bactérias do gênero *Salmonella* de amostras de fezes de cães e coiotes, enquanto White *et al.* (2003) e Wong *et al.* (2006) isolaram bactérias do mesmo gênero de petiscos para animais domésticos.

Bactérias como *Escherichia coli* são comuns do intestino humano e outros animais, mas existem cepas que podem causar infecções intestinais ou fora do intestino (BEUTIN, 1999). Segundo Beutin (1999), bactérias dessa espécie causadoras de infecções intestinais isoladas de animais e humanos mostraram diferentes virulências e especificidades para humanos e animais. Entretanto, as causadoras de infecções extra intestinais isoladas de cães, gatos e humanos demonstraram alguns antígenos e atributos de virulência semelhantes, bem como uma alta relação genética, podendo ser atribuída a grupos clonais. Devido à alta semelhança na posição de cromossomos e algumas sequências de DNA, sugere-se que cepas de *E. coli* humanas e caninas relacionadas de forma clonal podem ser transmitidas como

patógenos urinários entre os mesmos (BEUTIN, 1999), como apresentado pelos estudos de Zhang et al. (2016) e Damborg, Nielsen e Guardabass (2009).

Figura 3: *Staphylococcus* (amostra 5) à esquerda e *Escherichia coli* (amostra 6) à direita

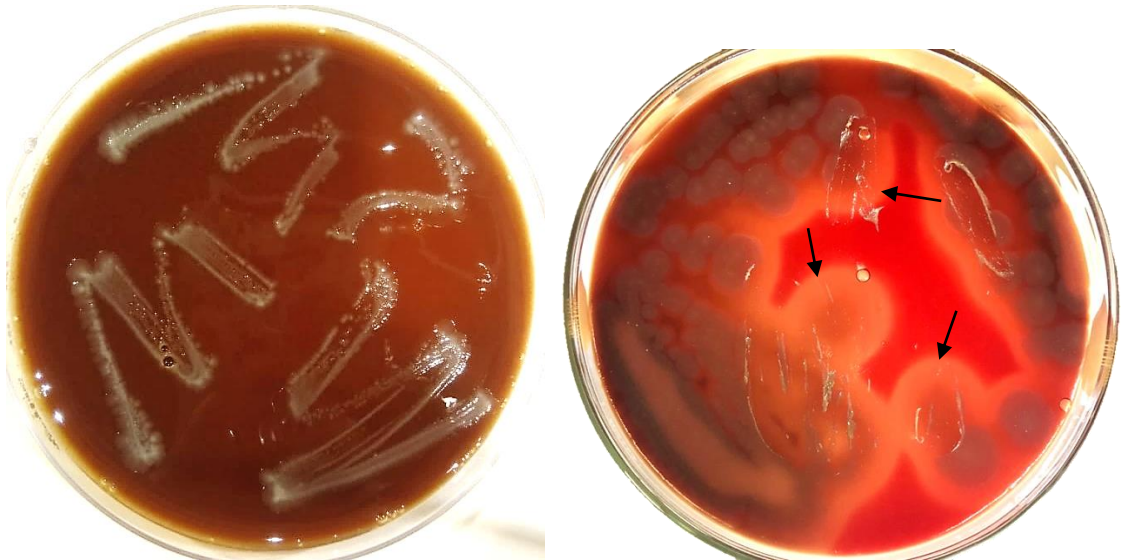


a) *Staphylococcus* (amostra 5), cor do meio azul indica bactéria não fermentadora de lactose.

b) *Escherichia coli* (amostra 6), cor do meio amarelo, indica bactéria fermentadora de lactose.

Fonte: Autor

Figura 4: *Haemophilus* (amostra 6) à esquerda e *Streptococcus* (amostra 2) à direita



No isolamento de *Streptococcus* (amostra 2) no lado direito da imagem, os halos de hemólise estão indicados pelas setas de cor preta.

Fonte: Autor

Tabela 2: Gêneros sugestivos bacterianos encontrados

Amostra	Porte do Cão	Ágar Sangue	Ágar Chocolate	Ágar MacConkey	Ágar CLED	Ágar S-S	<i>Yersinia</i>	Catalase	Ferm. Lactose	Morfologia
1	Pequeno	ND	ND	<i>Staphylococcus</i>	ND	ND	ND	+	+	Coco, G +
		ND	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	+	-	Bacilo, G -
2	Médio	<i>Streptococcus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	Coco, G +
3	Médio	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	Grande	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND	+	Bacilo, G -
		ND	ND	<i>Salmonella</i>	ND	ND	ND	+	-	Bacilo, G -
5	Médio	ND	ND	<i>Pseudomonas</i>	ND	ND	ND	+	-	Bacilo, G -
		ND	ND	<i>Staphylococcus</i>	ND	ND	ND	+	+	Coco, G +
		ND	ND	ND	<i>Staphylococcus</i>	ND	ND	+	-	Coco, G +
6	Médio	ND	<i>Haemophilus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Cocobacilo, G -
		ND	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	+	Bacilo, G -
		ND	ND	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND	+	Bacilo, G -
7	Grande	ND	ND	ND	<i>Enterococcus</i>	ND	ND	-	+	Coco, G +

ND: Não detectado

Fonte: Elaborada pelo autor

Transmissões de bactérias do gênero *Streptococcus* a humanos podem ocorrer através da mordida de cães (OEHLER et al., 2009). Foram registrados dados de transmissão pelo contato com cães infectados por *Streptococcus zooepidemicus* (PRIESTNALL; ERLES, 2011) e *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) (SCHRIEBER et al., 2013). *S. zooepidemicus* é uma bactéria patogênica oportunista presente em cavalos, o qual foi introduzida provavelmente pelo contato direto entre estes e os cães, os quais apresentam os mesmos sintomas que os equinos mediante infecção (PRIESTNALL; ERLES, 2011). Já SDSE é um patógeno humano importante, os quais algumas cepas apresentam virulência para ambos cães e humanos, provavelmente pela troca de material genético entre *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus canis* (SCHRIEBER et al., 2013). Como apresentado por Abbott et al. (2010) e Schrieber et al. (2013), o contato com cães infectados pelas referidas bactérias pode resultar em transmissão das mesmas para humanos.

Segundo Clapper e Meade (1962), bactérias do gênero *Haemophilus* foram encontradas na flora nasal de cães, e podem ser transmitidas a humanos, como sugerido por Yamashita, Bone e Hitchcock (1972) causando abscesso cerebral, e Varghese et al. (1977) causando endocardite.

Casos de transmissão de bactérias do gênero *Staphylococcus* entre cães e humanos, embora dados como ocorrências raras, têm sido relatados com o passar dos anos. Lozano et al. (2017) e Van Duijkeren et al. (2011) relatam casos de transmissão de *Staphylococcus pseudintermedius* de cães a humanos. Tem-se também relatos de ocorrência contrária. Van Duijkeren et al. (2004) relata caso de transmissão de *Staphylococcus aureus* de humanos para cães.

Para o gênero *Pseudomonas* os ocorridos são semelhantes. Michl, Beck e Mainz (2017) relatam um caso de transmissão de *Pseudomonas aeruginosa* de cão para humano, enquanto Fernandes et al. (2018) relatam transmissão desta de humano para cão.

Johnson et al. (2006) relatam transmissão de *Enterococcus faecalis* de cão para humano através de mordida. Já Damborg et al. (2009) relatam que cães são reservatórios de *Enterococcus faecium* e as transmitem a humanos.

Segundo Marks e Kather (2003), infecções por *Salmonella* em cães são raras, mas ocorrem mais frequentemente em filhotes e populações em canis. A presença dessa bactéria em alimentos e fezes caninas apresenta um alto risco de contaminação

para os animais e para as pessoas que vivem em contato direto com os mesmos, como relatado por Sato *et al.* (2000) e Morse *et al.* (1976).

6.2 TESTE ANTIBIOGRAMA

Nos testes de antibiograma (tabela 2), linhagens de *Escherichia coli* (derivadas das amostras 1, 4 e 6), bem como *Streptococcus* (amostra 2), *Salmonella* (amostra 4) e *Pseudomonas* (amostra 5) apresentaram resistência total para amoxicilina + clavulanato de potássio (não houve formação de halo ao redor dos 3 discos de papel), como demonstrado na figura 6 (*Escherichia coli* da amostra 1 e *Streptococcus* da amostra 2). Ainda para este antibiótico, uma linhagem de *Haemophilus* (amostra 6) apresentou halo de inibição somente ao redor de um disco (dos 3 utilizados) como apresentado na figura 5. No caso do cloranfenicol, uma linhagem do gênero *Pseudomonas* (amostra 5), demonstrado também na figura 5, apresentou resistência total. Ainda para este antimicrobiano, o isolado *Staphylococcus* (amostra 5) apresentou halo de inibição apenas ao redor de dois discos, e para o isolado *Streptococcus* (amostra 2) houve o desenvolvimento de colônias resistentes dentro do halo de inibição. Nos testes com azitromicina, uma linhagem de *Escherichia coli* (amostra 1) apresentou halo de inibição em somente um dos discos, enquanto que os isolados *Escherichia coli* (amostra 4), *Pseudomonas* (amostra 5) e *Haemophilus* (amostra 6) apresentaram halo de inibição em dois discos somente. Os testes não foram possíveis para o isolamento *Enterococcus* (amostra 7) pela ausência de proliferação do mesmo na placa.

Bactérias *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de humanos, cães e do ambiente de convivência, apresentaram resistência para cloranfenicol e outros antibióticos de acordo com Fernandes *et al.* (2018), enquanto que bactérias da mesma espécie isoladas por Oliveira *et al.* (2005) a partir de exsudato ótico de cães, apresentaram grau de resistência a cloranfenicol. Cem por cento (100%) dos 39 isolados de *P. aeruginosa* de amostras caninas por Pedersen *et al.* (2007) apresentaram resistência a amoxicilina com ácido clavulânico e outros antibióticos, enquanto 89,7% apresentaram resistência a cloranfenicol e outros antibióticos. No estudo de Pereira *et al.* (2009), de 9 isolados de *P. aeruginosa*, 42,8% apresentaram resistência a azitromicina e a cloranfenicol e 57,1% à amoxicilina.

Tabela 3: Resultados do teste antibiograma

Gêneros isolados	Amostra/ nºisolados	Cloranfenicol			Amoxicilina /clav. de potássio			Azitromicina	
		Média controle (cm)	Resistência/ sensibilidade	Média teste (cm)	Resistência/ sensibilidade	Média teste (cm)	Resistência/ sensibilidade	Média teste (cm)	
<i>Staphylococcus</i>	1/1	Total ^a	S	Total ^a	S	Total ^a	S	Total ^a	
<i>Escherichia coli</i>	1/1	0,26	S	0,33	R	0	<u>S</u>	0,1	
<i>Streptococcus</i>	2/1	0,53	S	0,16	R	0	S	0,43	
<i>Escherichia coli</i>	4/1	0,23	S	0,23	R	0	<u>S</u>	0,15	
<i>Salmonella</i>	4/1	0,4	S	0,56	R	0	S	0,16	
<i>Pseudomonas</i>	5/1	0,5	R	0	R	0	<u>S</u>	0,4	
<i>Staphylococcus</i>	5/2	0,76 0,86	S	0,25 1,03	S	0,4 0,76	S	0,76 Total	
<i>Haemophilus</i>	6/1	0,4	S	0,5	<u>S</u>	0,2	S	0,2	
<i>Escherichia coli</i>	6/2	0,43	S	0,76 0,66	R	0	S	0,23	

S = Sensível

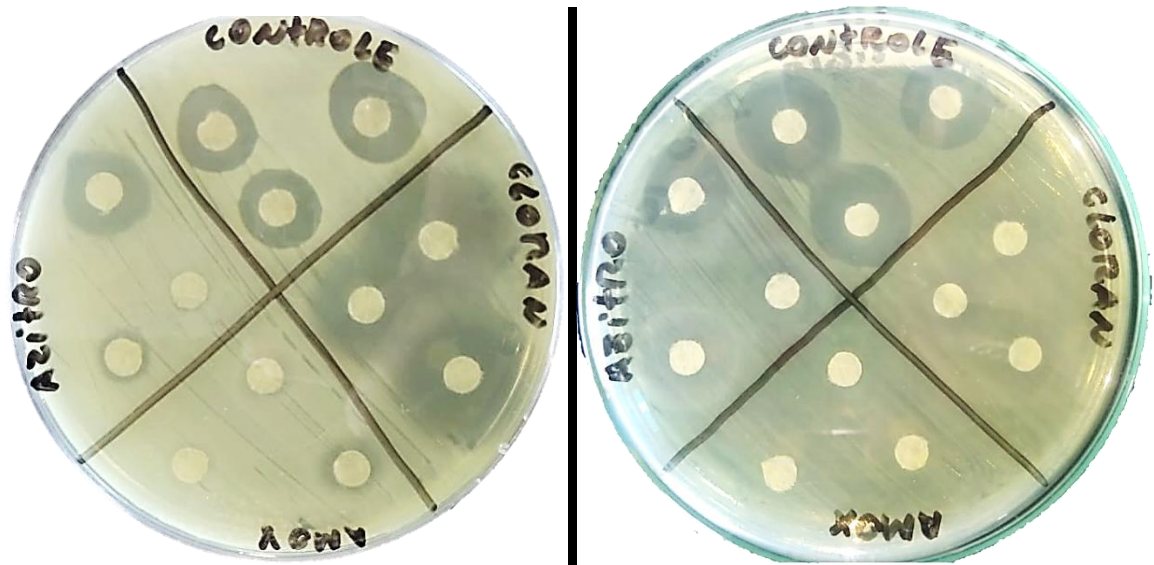
S = Sensibilidade parcial (somente um halo de inibição obtido)

R = Resistente

Total^a = Halos muito amplos

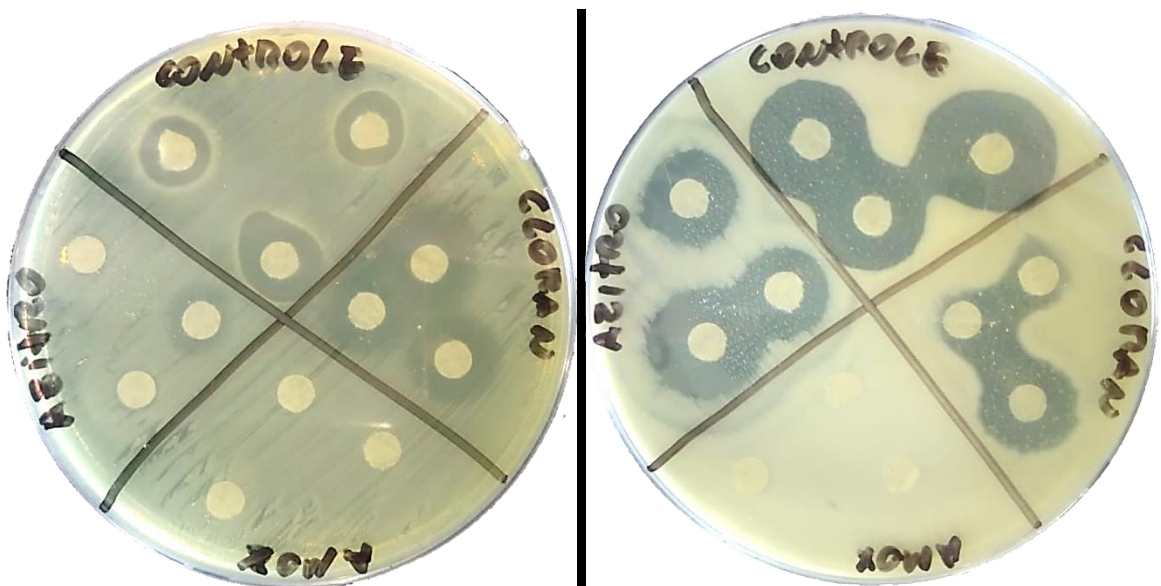
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 5: *Haemophilus* (amostra 6) à esquerda e *Pseudomonas* (amostra 5) à direita



Fonte: Autor

Figura 6: *Escherichia coli* (amostra 1) à esquerda e *Streptococcus* (amostra 2) à direita



Fonte: Autor

De acordo com Costa *et al.* (2004), de um total de quatro isolados de *Escherichia coli* resistentes a cefalosporina de amplo espectro isoladas de fezes de cães, uma cepa apresentou resistência também a cloranfenicol. Já nos estudos de Gibson *et al.* (2008), de 57 isolados de *E. coli* de amostras caninas, 29 apresentaram resistência à amoxicilina com ácido clavulânico e 7 a cloranfenicol. Em relação à azitromicina, Zogg *et al.* (2018) encontraram um gene de resistência a esse antibiótico mediado por plasmídeo em 13 de 64 isolados de *E. coli* de amostras de cães e gatos.

De 19 isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivos a partir otite externa canina, 52,6% apresentaram resistência para amoxicilina, 57,9% para azitromicina e 94,7% para cloranfenicol de acordo com o trabalho de Pereira *et al.* (2009). Neste mesmo trabalho, de 4 isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativa, 50% apresentaram resistência à amoxicilina, 50% à azitromicina e 100% de resistência a cloranfenicol. Dos 201 isolados de *Staphylococcus intermedius* de cães, Pedersen *et al.* (2007) identificou 12,9% resistentes a cloranfenicol e nenhuma resistência a amoxicilina com ácido clavulânico.

Dos 34 isolados de *Streptococcus canis* de amostras caninas, Lyskova, Vydrzalova e Mazurova (2007) não identificaram resistência para cloranfenicol nem para amoxicilina com ácido clavulânico. Dos isolados encontrados por Petrov *et al.* (2013), 5% dos 25 isolados apresentaram resistência para amoxicilina com ácido clavulânico e nenhum apresentou resistência para cloranfenicol.

White *et al.* (2003) obtiveram 78 isolados de *Salmonella* a partir de petiscos para cães, dos quais 8% apresentaram resistência a cloranfenicol. De 13 isolados de *Salmonella* de cães no Irã, um apresentou genes de resistência a cloranfenicol como descrito por Torkan, Khamesipour e Anyanwu (2015), enquanto que 27 linhagens de *Salmonella* isoladas de amostras fecais caninas na Tailândia apresentaram resistência a Amoxicilina (POLPAKDEE *et al.*, 2012).

Tavares (2014) isolou *Enterococcus* da boca e coração de cães, dos quais mais de 5 isolados apresentaram resistência a cloranfenicol e menos de 5 isolados apresentaram resistência à amoxicilina associada a ácido clavulânico em dosagens da medicina veterinária. Nos testes com dosagem da medicina humana, 5 isolados apresentaram resistência a cloranfenicol. No trabalho realizado por Lyskova, Vydrzalova e Mazurova (2007), os autores encontraram um isolado desse gênero resistente a amoxicilina com ácido clavulânico e 4 isolados resistentes a cloranfenicol. Segundo Bortolaia e Guardabassi (2015), há registros de transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias do gênero *Enterococcus* de animais e humanos, possuindo relevância clínica, demandando mais estudos a respeito.

Em nosso trabalho, o isolado do gênero *Pseudomonas* que apresentou múltipla resistência é relevante, pois, nas UTIs hospitalares, infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplos medicamentos são um problema grave para pacientes debilitados. Essa múltipla resistência prevalece nesse setor devido à necessidade frequente de utilização de antibióticos (MOHAMMADI, 2014). A infecção mais

prevalente é a pneumonia resultante da ventilação mecânica, apresentando taxa de mortalidade em aproximadamente 80% dos casos, principalmente se for causada por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* ou *Acinetobacter* (TURKOVIC, 2015). Entre as bactérias mais resistentes associadas a infecções em hospitais, estão *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, e *Enterobacter spp.* (RODRIGUES *et al*, 2018).

Mesmo sendo domésticos e tendo menor contato com ambientes e animais contaminados, ainda assim os cães de estimação podem ser fontes de disseminação de micro-organismos potencialmente patogênicos, inclusive resistentes a antibióticos, entre eles, uma considerável resistência ao composto amoxicilina+clavulanato de potássio, sendo que 7 dos 11 isolados testados, apresentaram resistência ao composto (Tabela 2). O uso indiscriminado de antibióticos deve ser evitado e a conscientização da população ao seu respeito deve ser muito frisada, pois o desenvolvimento de resistência pelas bactérias dificulta muito o tratamento dos doentes, podendo levá-los a óbito. O uso de tratamentos mais potentes, de forma a tentar combater o micro-organismo resistente causador da infecção, pode resultar em efeitos colaterais indesejados, diminuindo ainda mais o bem-estar do paciente e podendo causar outras complicações. A resistência bacteriana é uma discussão de extrema importância atualmente, e que demanda urgentemente a tomada de medidas e precauções que possam reduzir esse impacto á longo prazo (QUEIROZ, 2004; IACG, 2019).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande quantidade de resistência à amoxicilina + clavulanato de potássio, expressa por 63,6% dos isolados testados, traz consigo, juntamente às outras resistências apresentadas neste trabalho, uma grande preocupação. Sabendo-se das possibilidades de doenças que podem ser transmitidas entre cães e seus donos, a presença de bactérias resistentes torna essa possibilidade ainda mais grave. A resistência de bactérias a antibióticos torna cada vez mais difícil o tratamento de infecções, colocando a vida de homens e animais em risco.

Como citado anteriormente, a capacidade das bactérias de compartilhar material genético torna-as muito perigosas, visto que além de características de resistência a antimicrobianos, estas podem adquirir virulências. Assim, além de se tornarem resistentes, podem adquirir capacidade de infectar mais espécies de animais, podendo ser transmitidas de animais à humanos e vice-versa. Por isso, estudos de identificação dos mecanismos de resistência, vêm sendo feitos mais frequentemente para o desenvolvimento de medicamentos mais efetivos, acompanhando as mutações e resistências adquiridas por esses micro-organismos.

A conscientização do uso de antibióticos tem sido pregada fortemente, visto que o uso indevido e em excesso desses medicamentos é o maior causador da seleção de bactérias resistentes. Os dados obtidos neste trabalho podem ser úteis para conscientização do uso destes medicamentos, bem como para avaliação do risco envolvido no contato muito íntimo com os animais de estimação. Trabalhos envolvendo a conscientização da população dos cuidados básicos necessários ao lidar com esses animais também podem ser feitos utilizando os dados do referente trabalho. Esses dados também se mostram úteis na avaliação do desenvolvimento de resistência a antimicrobianos das cepas bacterianas locais de Foz do Iguaçu, possibilitando a tomada de medidas para evitar riscos à saúde da população. Assim, os objetivos propostos para este trabalho foram atingidos, que juntando-se a outros trabalhos na área, contribuem para a prevenção do desenvolvimento de micro-organismos resistentes e para a conscientização dos profissionais da saúde e da população em geral sobre o uso de antimicrobianos.

8. REFERÊNCIAS

ABBOTT, Y. *et al.* Zoonotic transmission of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* from a dog to a handler. **Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], p. 120–123, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**. Brasília: [s. n.], 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE**. 1. ed. Brasília: [s.n.], 2010.

BAILIE, W. E.; STOWE, E. C.; SCHMITT, A. M. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 223–231, 1978.

BEUTIN, Lothar. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. **Veterinary Research, BioMed Central**, [S. l.], p. 285-298, 1 jan. 1999.

BORTOLAIA, Valeria; GUARDABASSI, Luca. Zoonotic Transmission of Antimicrobial Resistant Enterococci: A Threat to Public Health or an Overemphasised Risk?. *In*: SING, A. (ed.). **Zoonoses–Infections Affecting Humans and Animals**. [S. l.]: Springer Science+Business Media Dordrecht, 2015. cap. Chapter 16, p. 407-431.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE CIÊNCIA, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Uso racional de medicamentos: Temas Selecionados**. Brasília: Athalaia, 2012.

CAETANO, Norival (ed.). **BPR – guia de remédios 2016/17**. 13. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

CASTANHEIRA, BRUNO ALEXANDRE MARTINS GUERREIRO. **MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS**. 2013. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E

TECNOLOGIAS, FACULDADE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DA SAÚDE, Lisboa, 2013.

CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES - FOZ DO IGUAÇU. **O que é o CCZ.** Disponível em: <<https://pmficomunicacao.wixsite.com/cczfoz/o-que-e-o-ccz>>. Acesso em: 11 maio 2019.

CHISHOLM, Stephanie A.; DAVE, Jayshree; ISON, Catherine A. High-Level Azithromycin Resistance Occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a Result of a Single Point Mutation in the 23S rRNA Genes. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, [S. l.], p. 3812–3816, 1 set. 2010.

CLAPPER , W. E.; MEADE, G. H. NORMAL FLORA OF THE NOSE, THROAT, AND LOWER INTESTINE OF DOGS. **The Lovelace Foundation for Medical Education and Research**, Albuquerque, New Mexico, p. 643-648, 18 out. 1962.

COSTA, Daniela *et al.* Detection of CTX-M-1 and TEM-52 b-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], p. 960-961, 7 out. 2004.

D'AOUST, J.-Y.; MAURER, J. *Salmonella* Species. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, [S. l.], p. 187–236, 2007.

DAMBORG, Peter *et al.* Dogs Are a Reservoir of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* Lineages Associated with Human Infections. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], p. 2360–2365, 1 abr. 2009.

DAMBORG, P.; NIELSEN, S. S.; GUARDABASS, L. *Escherichia coli* shedding patterns in humans and dogs: insights into within-household transmission of phylotypes associated with urinary tract infections. **Epidemiol. Infect.**, [S. l.], p. 1457–1464, 10 mar. 2009.

DE FRANCESCO, Vincenzo *et al.* Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. **World J Gastrointest Pathophysiol**, [S. l.], p. 35-

41, 15 jun. 2011.

DIAS, Renata Cristina Ferreira; THOMAZ-SOCCOL, Vanete; PASQUALI, Aline Kuhn Sbruzzi; *et al.* Variables associated with the prevalence of anti-leishmania spp. Antibodies in dogs on the tri-border of foz do iguaçu, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 3, p. 338–347, 2018.

ELLIOTT, David R.; WILSON, Michael; BUCKLEY, Catherine M. F.; *et al.* Cultivable oral Microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5470–5476, 2005.

ENGBERG, Jorgen *et al.* Quinolone and Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: Resistance Mechanisms and Trends in Human Isolates. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], p. 24-34, jan/fev. 2001.

FERNANDES, Miriam R. *et al.* Zooanthroponotic Transmission of DrugResistant *Pseudomonas aeruginosa*, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], p. 1160-1162, 6 jun. 2018.

FERRAREZE, Maria Verônica Guilherme *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem?. **Acta Paul Enferm**, [S. l.], p. 7-11, 2007.

FORTES, Fernanda Silva. **INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp. EM CÃES NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS E EM CAPIVARAS NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.** Dissertação (Pós-graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, 2010.

GIBSON, J.S. *et al.* Multidrug-Resistant *E. coli* and *Enterobacter* Extraintestinal Infection in 37 Dogs. **J Vet Intern Med**, [S. l.], p. 844–850, 2008.

GÓIS, Fernando Rodrigues. **INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS (gênero Flavivírus) DE INTERESSE À SAÚDE PÚBLICA EM MOSQUITOS (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) EM FÓZ DO IGUAÇU, PARANÁ.** Dissertação (Pós-graduação em

Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, 2017.

GUARDABASSI, Luca; JENSEN, Lars B.; KRUSE, Hilde. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. [S. l.]: Artmed, 2010.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUIMARÃES, Aline Caixeta *et al.* Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [S. l.], p. 864-869, set./out., 2011.

IACG - INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. **NO TIME TO WAIT: SECURING THE FUTURE FROM DRUG-RESISTANT INFECTIONS**: REPORT TO THE SECRETARY-GENERAL OF THE UNITED NATIONS. 2019.

JAY-RUSSELL, Michele T. *et al.* Prevalence and Characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* Strains Isolated from Stray Dog and Coyote Feces in a Major Leafy Greens Production Region at the United States-Mexico Border. **PLOS ONE**, [S. l.], p. 1-14, 20 nov. 2014.

JOHNSON, J. K. *et al.* Dog Bite Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria to a Human. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [S. l.], p. 762–763, 2006.

KILIAN, M. *Haemophilus*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, [S. l.], p. 1–47, 2015.

LABORCLIN. **Manual Para Antibiógrama: Difusão em Disco (Kirby & Bauer)**. [S. l.: s. n.], 2011.

LEVY, Carlos Emílio. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção**

em Serviços de Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

LOZANO, C. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [S. l.], p. 268–270, 2017.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, [S. l.], p. 1051–1060, 2000.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, [S. l.], p. 559–563, 1 jan. 2007.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARKS, S. L.; KATHER, E. J. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [S. l.], p. 1029–1060, 2003.

MBIOLOG DIAGNÓSTICOS LTDA. **Agar MacConkey- Mbiolog**. [s.l.: s.n.], 2010.

MICHL, R.; BECK, J.; MAINZ, J. Cystic Fibrosis Patient's best friend? Potential Transmission of *Pseudomonas aeruginosa* from a Dog. **Klinische Pädiatrie**, [S. l.], p. 245–246, 2017.

MOHAMMADI, P. *et al.* Neonatal bacteremia isolates and their antibiotic resistance pattern in neonatal insensitive care unit (NICU) at Beasat Hospital, Sanandaj, Iran. **Acta Med Iran**. 2014.

MORALES G., Yolanda Elizabeth; HERRERA, Ma. Carmen; MUÑOZ R., Jesús. Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, A.C. Distrito Federal, México, p. 58-69, janeiro-março, 2007.

MORSE, ERSKINE V. *et al.* Canine Salmonellosis: A Review and Report of Dog to Child Transmission of *Salmonella enteritidis*. **PUBLIC HEALTH BRIEFS**, [S. l.], p. 82-84, 1 jan. 1976.

MOSHER, Roy H. *et al.* Inactivation of Chloramphenicol by O-Phosphorylation. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, [S. l.], p. 27000 –27006, 6 set. 1995.

MURRAY, I.; SHAW, W. O-acetyltransferases for Chloramphenicol and Other Natural Products. **Antimicrob Agents Chemother**, [S. l.], p. 1-6, 1997.

NEOGEN CORPORATION. **Ágar seletivo yersinia (iso) – yersinia selective agar (7257)**. [s.l.: s.n.], 2011.

NOGUEIRA, Paula Sacha Frota *et al.* PERFIL DA INFECÇÃO HOSPITALAR EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO. **Revista enfermagem UERJ**, Rio de Janeiro, p. 96-101, jan/mar. 2009.

OEHLER, Richard L. *et al.* Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], p. 439-447, 2009.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – PAHO. Florida International University. **Recommendations for Implementing Antimicrobial Stewardship Programs in Latin America and the Caribbean: Manual for Public Health Decision-Makers**. Washington, D.C.: PAHO, FIU; 2018.

PEDERSEN, Karl *et al.* Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], p. 775– 781, 20 jul. 2007.

PEGADO, Francisco José Nogueira. **Infecções orais por *Streptococcus spp.* e suas repercussões por via sistêmica: relevância clínica em Medicina Dentária?** Universidade Fernando Pessoa, 2010.

PEREIRA, I.A. *et al.* Suscetibilidade à azitromicina de agentes bacterianos isolados de processos infecciosos em diferentes sítios de animais de companhia. **Arq. Bras. Med.**

Vet. Zootec, [S. l.], p. 577-584, 8 abr. 2009.

PETROV, V. *et al.* Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. **Revue Méd. Vét.**, [S. l.], p. 18-22, 2013.

POLPAKDEE, Arunee *et al.* Epidemiology and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* sp. Isolated from Dogs and Cats in Northeastern Thailand. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, [S. l.], p. 618-621, 1 jan. 2012.

PRIESTNALL, S.; ERLES, K. *Streptococcus zooepidemicus*: An emerging canine pathogen. **The Veterinary Journal**, [S. l.], p. 142–148, 2011.

QUEIROZ, Neusa Santos de. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, Santa Catarina, p. 64-70, 2004.

RAMOS, Anselmo Silva *et al.* BACTEREMIA TRANSITÓRIA EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL EM DIFERENTES PROCEDIMENTOS ODONTOLÓGICOS E USUAIS. **Rev. Bras. Med. Vet.**, [S. l.], p. 79-84, abr/jun. 2011.

RODRIGUES, T. S. *et al.* Resistência Bacteriana á Antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. **Rev Pre Infec e Saúde**. 2018.

SATO, Yoshihiko *et al.* *Salmonella* Virchow Infection in an Infant Transmitted by Household Dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, [S. l.], p. 767-769, 7 mar. 2000.

SCHRIEBER, L. *et al.* Transmission of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* between Child and Dog in an Aboriginal Australian Community. **Zoonoses and Public Health**, [S. l.], p. 145–148, 2013.

SEFTON, A. M. Mechanisms of Antimicrobial Resistance. **Drugs**, [S. l.], p. 557–566, 2002.

SILVA, Elaine Alves da; SILVA, Priscila Reina Siliano da. INVESTIGAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA SALIVA DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **Revista Saúde em Foco**, v. 1, n. 2, p. 109–122, 2014.

STAPLETON, PAUL *et al.* Incidence and Mechanisms of Resistance to the Combination of Amoxicillin and Clavulanic Acid in *Escherichia coli*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, [S. l.], p. 2478–2483, 1 nov. 1995.

TAVARES, MARTA MONTEIRO PAIS. **CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS SPP.* ISOLADOS DA BOCA E DO CORAÇÃO DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL**. 2014. DISSERTAÇÃO (MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA) - UNIVERSIDADE DE LISBOA - Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2014.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C. *Enterococcus*. In: DE FILIPPIS, I.; MCKEE, M.L. (ed.). **Molecular Typing in Bacterial Infections**. New York: Springer Science+Business Media, 2013. cap. 2, p. 17–26.

TORKAN, S.; KHAMESIPOUR, F.; ANYANWU, M. U. Detection of virulence and antibacterial resistance genes in *Salmonella* isolates from diarrhoeic dogs in Iran. **Revue Méd. Vét**, [S. l.], p. 221-228, 2015.

TURKOVIC, T. M. *et al.* Microbial profile and antibiotic susceptibility patterns of pathogens causing ventilator-associated pneumonia at intensive care unit, seestre milosrdnice university hospital center, Zagreb, Croatia. **Acta Clin Croat**. 2015.

VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], p. 338–343, 14 fev. 2011.

VAN DUIJKEREN, Engeline *et al.* Human-to-Dog Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], p. 2235-2237, 12 dez. 2004.

VARGHESE, R. *et al.* Endocarditis due to *Hemophilus aphrophilus*. **Chest**, [S. l.], p. 680–682, 5 nov. 1977.

WHITE, D. G. *et al.* Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella* serovars isolated from animal-derived dog treats in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], p. 860–863, 30 set. 2003.

WONG, T.L. *et al.* *Salmonella* serotypes isolated from pet chews in NewZealand. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], p. 803-810, 19 dez. 2006.

YAMASHITA, J.; BONE, F. J.; HITCHCOCK, EDWARD. Brain abscess due to *Haemophilus aphrophilus*: case report. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, [S. l.], p. 909-911, 1972.

ZHANG, Xue-Fei *et al.* Possible Transmission of mcr-1–Harboring *Escherichia coli* between Companion Animals and Human. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], p. 1679-1681, 9 set. 2016.

ZOGG, A. L. *et al.* Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats and dogs in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], p. 79–84, 2018.

ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO DE COLETA DE SALIVA**

Eu, _____, autorizo a coleta da saliva do meu cão, _____, pela acadêmica Lígia Abboud Gerke, para fins de trabalho acadêmico de conclusão de curso, pela Universidade Federal de Integração Latino-Americana.

A acadêmica se compromete a enviar por e-mail ou aplicativo de mensagens (Whatsapp) os resultados globais obtidos das coletas efetuadas, sem identificação individual dos cães participantes do referente estudo.

Desejo receber os resultados: Sim ☐ Não ☐

Se sim:

Telefone: _____

E-mail: _____

Assinatura do responsável